This Page Is Inserted by IFW Operations and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- · TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents will not correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

世界知的所有梅機関

PCT

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

W096/17073 (11) 国際公開番号 (51) 国際特許分類6 A1 C12N 15/87, 5/10, C07K 14/78 1996年6月6日(06.06.96) (43) 国際公開日 (74) 代理人 PCT/JP95/02425 (21) 国際出願書号 弁理士 青山 葆,外(AOYAMA, Tameton et al.) 1995年11月29日(29.11.95) (22) 国際出版日 〒540 大阪府大阪市中央区域見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP) (30) 優先権データ TP **鈴崎平6/317721** 1994年11月29日(29.11.94) (81) 指定国 AL. AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK. (71) 出順人 (米国を除くすべての指定国について) HE. ES. FL GB, GE, HU. IS. JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LS, 會商品株式会社 LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL. PT. (TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP] RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, 〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyete, (JP) 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU. (72) 発明者;および MC, NL, PT, SE), OAPIN IT (BF, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, (75) 発明者/出順人 (米国についてのみ) ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPOMPH (KE, LS, MW, SD, SZ. 编页仁一(HASHINO, Kimikazu)[JP/JP] m. 〒569 大阪府高棚市明野町27-3 Osaka, (JP) 松下秀之(MATSUSHITA, Hidoyaki)[JP/JP] 国際調査報告書 赵什公里書棚 〒525 滋賀県草津市西欧川2丁目12-1 ハーモバレス草準401号 Shiga, (JP) 加藤都之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒611 京都府字治市南駿町1-1-150 Kyoto, (JP)

(54) Tide : PROCESS FOR PRODUCING TRANSFORMED CELL

(54) 発明の名称 形質転換細胞の製造方法

(57) Abstract

A process for producing transformed cells by introducing foreign genes into target cells through piercing, which comprises the step of culturing the target cells having the foreign genes injected thereinto in the presence of a cell adhesion-active substance; and a kit for producing transformed cells suitable for use in the above method and comanning as the extensial impredients the cells to be transformed with foreing genes by this method and a cell adhesion-active substance.

(57) 要約

穿孔法を用いて外来遺伝子を標的細胞に導入し、形質転換細胞を製造するに際し、標的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質の存在下で培養する工程を包含する外来遺伝子による形質転換細胞の製造方法、該方法によって製造される外来遺伝子による形質転換細胞および細胞接着活性物質を必須の構成成分とする該方法で使用するに通した形質転換細胞製造用キットを開示する。



田 細

形質転換細胞の製造方法

技術分野

本発明は、形質転換細胞の製造方法、さらに詳しくは、細胞工学、遺伝 子工学、発生工学などの分野において標的細胞への外来遺伝子導入を効率 良く行うことを可能にする方法に関する。

背景技術

標的細胞内への外来遺伝子導入方法には、リン酸カルシウム法、DEAEーデキストラン法、リボソーム法、エレクトロボレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法などが知られている。いずれの方法も操作法、効率、細胞に対するダメージなどの点で一長一短がある。中でもエレクトロボレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等の穿孔法は、特別な試薬を用いることなく細胞の取扱いが可能であり、導入効率も良好である。しかしながら、穿孔による細胞のダメージは免れない。

本発明の目的は、穿孔法により欄的細胞内へ外来遺伝子を導入して形質 転換細胞を製造する際の、導入効率を向上させる方法を提供することにあ る。さらに、該方法に用いるキットを提供することも目的とする。

発明の概要

本発明の第1の発明は形質転換細胞の製造方法に関する発明であって、 穿孔法を用いて形質転換細胞を製造する方法において、穿孔法を用いて標 的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質 の存在下で培養する工程を包含することを特徴とする。

本発明の第2の発明は、本発明の製造方法で製造される外来遺伝子による形質転換細胞に関する発明である。

また、本発明の第3の発明は、形質転換細胞製造用キットに関する発明 であって、上配第1の発明の形質転換細胞の製造方法に使用するキットで あって、細胞接着活性物質を含有することを特徴とする。

発明の詳細な説明

本発明の方法は、穿孔法を用いて標的細胞に外来遺伝子を導入した後に、 細胞接着活性を有する物質の存在下この細胞を培養することを特徴とする。

本発明において穿孔法とは、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等であり、細胞壁の穿孔により、遺伝子を注入する方法である。エレクトロポレーション法とは、例えば、蛋白質、核酸、酵素、第31巻、第1591~1603頁(1986)に配載の方法であり、マイクロインジェクション法とは、例えば、セル(Cell)、第22巻、第479~488頁(1980)に配載の方法であり、パーティクルガン法とは、例えば、テクニーク(Technique)、第3巻、第3~16頁(1991)に記載の方法であり、細胞に遺伝子を導入する方法として使用する公知の方法を包含する。

これらの穿孔法で使用される細胞としては、例えば、動物細胞を公知 [日本生化学会編: "新生化学実験講座18 細胞培養技術"、(第1版) (1990) 東京化学同人発行] の方法で調製すれば良く、また、培養動物細胞を使用しても良い。

細胞接着活性物質とは、細胞接着活性、すなわち標的細胞を細胞、ある いは組織内にある細胞間を満たす物質である細胞外マトリックス、またプ ラスチックやガラスなどの器質に接着させる活性を有する物質をいい、本

Z

発明においては、標的細胞の形質転換に悪影響を及ぼさない限り、いずれの酸活性を有する物質も使用できる。かかる活性とは、細胞をその形態を保持して、あるいは伸展、すなわち一またはそれ以上の方向に細胞が伸び、その形態が変化した状態で、例えば細胞接着活性物質を被覆した培養器具に固定する活性である。

細胞接着活性物質と標的細胞の結合は慣用の方法を使用して同様にアッセイすることができる。例えば、このような方法にはネイチャー(Nature)、352:438~441 (1991年)に配載された方法が含まれる。簡単に言えば、細胞接着活性物質はプラスチック皿上を被覆しており、そしてアッセイすべき細胞集団は培地に重層して30分から2時間置く。このインキュペーション期間後に、接着していない細胞を回収し、計数して生存性についてアッセイする。細胞接着活性物質と接着した細胞もトリプシンまたは細胞解離緩衝液(例えば、Gibco)を使用して回収し、計数しそして生存性を試験する。次に、接着細胞の割合を計算しそしてウシ血清アルブミン (BSA) 被覆プラスチック皿のような標準乃至標準対照と比較する。標的細胞とアッセイした細胞接着活性物質の実質的な接着によって、細胞接着活性物質/細胞の組合せを決定できる。または細胞伸展活性は、上配操作中、接着した細胞をトリプシンまたは細胞解離緩衝液を用いて解離させる前にその形態変化を顕微鏡下で観察することによって測定することができる。

細胞接着活性物質としては、例えば、細胞接着活性ポリペプチドまたは 該ポリペプチドの機能的同等物や細胞接着合成ポリマーが挙げられる。

本発明に使用する細胞接着活性を有するポリペプチドとしては、例えば、インペイシン、ポリリジン等の細胞外マトリックス由来以外の細胞接着活性ポリペプチド、例えば、特開平2-311498号公報に配載の細胞伸

展活性を示すポリペプチド、例えば、フィブロネクチン、ラミニン、コラ ーゲン、ピトロネクチン、オステオポンチン、トロンボスポンジン、テネ イシン等の細胞外マトリックスの構成成分等がある。細胞外マトリックス 構成成分は公知の方法 [インターナショナル ジャーナル オブ キャン サー(International Journal of Cancer)、第20巻、第1~5頁(19 77)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、第254卷、第9933~9937頁(197 9)、日本生化学会編: "統生化学実験講座 第6巻 細胞骨格の構造と 機能(下)"、(第1版)(1986)東京化学同人発行、セル ストラ クチャー アンド ファンクション (Cell Structure and Function)、第 13巻、第281~292頁(1988)、ジャーナル オブ バイオロ ジカル ケミストリー、第264巻、第18202~18208頁(19 89)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、第260巻、 第12240~12245頁(1985)]で、天然物、培養物より調製 することができる。細胞接着活性ポリペプチドとしては、実質的に純化さ れた細胞接着活性を示す細胞外マトリックス、実質的に純化された細胞外 マトリックスフラグメントまたはそれらの混合物でも良く、細胞接着活性、 細胞伸展活性を有するタンパク質、ポリペプチドおよびその機能的同等物 を使用することができる。

これらの細胞接着活性ポリペプチドは、実質的に純化された天然物を使用しても良く、その酵素学的、化学的分解物、またこれらの物質を遺伝子工学的に作成したものを使用しても良い。さらに、これらの物質の機能、すなわち細胞接着活性、細胞伸展活性を損なうことなく改変した物も使用することができる。なお本発明において、天然起顧のポリペプチドのアミノ酸配列のアミノ酸が欠失、置換、付加および/または挿入のいずれか一

つがなされていても所望の細胞接着活性、細胞伸展活性を有するポリペプチドを天然アミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的同等物という。すなわち、天然に存在するタンパク質にはそれをコードする遺伝子の多形や変異によりアミノ酸配列に変化が生じたものの他に、生成後のタンパク質の生体内および精製中の修飾反応などによって、そのアミノ酸配列中にアミノ酸の欠失、挿入、付加、置換等の変異が起こったものも含まれるが、それにも関わらず変異を有しないタンパク質と実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に差異があっても、その主要な機能を共通にしていると認められるものを機能的に同等の活性を有するポリペプチドと呼ぶ。

人為的にタンパク質のアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合 でも同様であり、この場合はさらに多種多様の変異体を作製することが可 能であるが、変異を有しないものと実質的に同等の生理活性を示す限り、 これらの変異体は機能的に同等の活性を有するポリペプチドと解釈される。

たとえば、大腸歯で発現されたタンパク質のN末端に存在するメチオニン残基は、多くの場合、メチオニンアミノペプチダーゼの作用により除去されるとされているが、タンパク質の種類によってはメチオニン残基を持つもの、持たないものの両方が生成される。しかしながら、このメチオニン残基の有無はタンパク質の活性に影響を与えない場合が多い。また、ヒトインターロイキン2 (IL-2) のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン2活性を保持することが知られている[サイエンス (Science)、第224巻、1431頁(1984)]。

さらに、遺伝子工学的にタンパク質の生産を行う際には、融合タンパク 質として発現させることがしばしば行われる。たとえば、目的のタンパク 質の発現量を増加させるために、目的のタンパク質のN末端に他のタンパク質由来のN末端ペプチド鎖を付加したり、目的のタンパク質のN末端、あるいはC末端に適当なペプチド鎖を付加して発現させ、この付加したペプチド鎖に親和性を持つ担体を使用することにより、目的のタンパク質の精製を容易にすることなどが行われている。

この点に関して、関連バイオテクノロジー技術は、対象の機能的領域中のアミノ酸の欠失、置換、付加または他の修飾を定型的に実施することができる状態にまで進歩している。次に、得られたアミノ酸配列は所望の細胞接着活性または細胞伸展活性について、上配の方法により定型的にスクリーニングすることができる。

細胞接着活性を有するポリペプチドは、分子内に細胞接着活性に必要なアミノ酸配列、例えば、配列表の配列番号1(RGDS)で表されるアミノ酸配列、配列表の配列番号2(CS1)で表されるアミノ酸配列、配列表の配列番号6(ラミニンの中心配列、YIGSR)で表されるアミノ酸配列より選択されるアミノ酸配列を含有する人工のポリペプチドでも良く、これらのポリペプチドは遺伝子工学的方法、化学合成方法で大量に調製でき、純化されたポリペプチドとして使用することができる。

分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特闘平1-180900号公報に記載の配列表の配列番号7で表されるポリペプチドがあり、該ポリペプチドは、Escherichia coli HB101/pTF1409(FERM BP-1939)を用いて該公報に記載の方法により調製することができる。また、下記表1に示す各配列表の配列番号で表されるポリペプチドも、各公報記載の遺伝子工学的方法により調製することができる。

なお、表1中の Escherichia coli HB101/pCHV90が含有す

るプラスミド HB101/pCHV90は、Escherichia coli HB101/pHD101(FERM BP-2264) および Escherichia coli JM109/pTF7021(FERM BP-1941)を用い、特闘平5-271291号公報記載の方法により調製することができる。

配列表の	生産菌	寄託番号
配列番号	(Escherichia coli)	
配列番号8	JM109/pTF7021	FERM BP-1941
配列番号9	HB101/pTF1801	FERM P-9948
配列番号3	JM109/pTF7221	FERM BP-1915
配列番号10	JM109/pTFB800	FERM BP-2126
配列番号11	HB101/pCH101	FERM BP-2799
配列番号12	JM109/pCF406	FERM P-10837
配列番号13	HB101/pCE102	FERM P-11226
配列番号14	JW109/pTF7520	FERN P-11526
	+VN-IN. TAA	
配列番号15	JM109/pTF7520	
	+Col *1	FERM P-11527
配列番号16	HB101/pCHV179	FERM P-12183
配列番号17	HB101/pCHV90	-
配列番号18	HB101/pCHV89	FERM P-12182
配列番号19	JM109/pTF7520Col	FERM BP-5277
配列 号20	ј≝109/рҮ≝Н-CF •	A FERM BP-5278
	配列番号 8 配列番号 9 配列番号 9 配列番号号 1 0 配列番号号 1 2 配列列番号号 1 2 配列列番号号 1 4 配列列番号 1 5 配列列番番号 1 7 配列列番号 1 7 配列列番号 1 8	配列番号 (Escherichia coli) 配列番号 8 JM109/pTF7021 配列番号 9 BB101/pTF1801 配列番号 1 JM109/pTF7221 配列番号 1 0 JM109/pTF78800 配列番号 1 1 BB101/pCE101 配列番号 1 2 JM109/pCF406 配列番号 1 3 BB101/pCE102 配列番号 1 4 JM109/pTF7520 +VN-IN. таа 配列番号 1 5 JM109/pTF7520 +Col ^{x1} 配列番号 1 6 BB101/pCEV179 配列番号 1 7 BB101/pCEV90 配列番号 1 8 BB101/pCEV89 配列番号 1 9 JM109/pTF7520Cal ^x

また、分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドは化学合成することもでき、例えば、特開平3-173828号公報に配載のポリRGDSを合成、使用しても良い。

分子内に配列表の配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特開平 2-311498 号公報に記載の配列表の配列番号 4 で表されるポリペプチドがあり、該ポリペプチドは Escherichia coli HB 101/p HD 102 (FERM P-1072) を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製することができる。また、特開平 3-284700 号公報に記載の方法に従い、配列表の配列番号 2 で表されるポリペプチドを化学合成しても良い。

さらに、分子内に配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列および配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列を含有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特開平2-311498号公報に配載の配列表の配列番号21で表されるポリペプチドかあり、該ポリペプチドは Escherichia coli HB101/pCH102(FERM BP-2800)を用いて公報に配載の方法により遺伝子工学的に調製することができる。また、特開平3-284700号公報に配載の配列表の配列番号5で表されるポリペプチドも分子内に配列表の配列番号1、2のアミノ酸配列を含有するポリペプチドであり、該ポリペプチドは Escherichia coli HB101/pCS25(FERM P-11339)を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製できる。

以上のように、本発明に使用するポリペプチドの例としては、分子内に 配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列 番号2で表されるアミノ酸配列を含有する細胞接着活性ポリペプチドかあ り、鉄ポリペプチドとしては、例えば、ヒト・フィブロネクチンの細胞接 着ドメイン [モッシャー、D. F. (Mosher, D. F.) 細: "フィブロネクチン" (Pibronectin)、第47~121頁 (1989) アカデミックプレス (Academic Press)発行] 由来ポリペプチドと同CS1ポリペプチド (同上刊行物) が共有結合したもの、CS1ポリペプチドを含有するヘバリン結合ドメイン (同上刊行物) 由来ポリペプチド、あるいは細胞接着由来ポリペプチドを使用することができ、これらはモれぞれ遺伝子工学的に作製することができる。例えば、細胞接着ドメイン由来ポリペプチドをコードするDN Aを含むベクター、CS1ポリペプチドをコードするDN Aを含むベクター、CS1ポリペプチドを含有するヘバリン結合ドメイン由来ペプチドをコードするDN Aを含むベクターから、それぞれ必要な領域を取出し、単独あるいは組合せて使用することにより、分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと分子内に配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドが共有結合したポリペプチドを作製する場合、ポリペプチド間の共有結合は、直接結合であってもよく、間接結合、例えば、スペーサーを介した間接結合であってもよい。スペーサーは、各領域の分子間距離を関節するための挿入配列であり、任意のペプチド鎖を用いることができ、例えば、フィブロネクチン分子中のCS1領域の上流配列であってもよい。スペーサー配列は遺伝子工学的に容易に導入することができる。

細胞接着合成ポリマーとしては、例えば、公知のポリーN-p-ビニルベンジルーD-ラクトンアミド(PVLA)が挙げられる。

本発明において、標的細胞は特に限定するものではないが、例えば、造

血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血細胞、ES細胞、リンパ球、癌細胞等が 挙げられる。

外来遺伝子も、特に限定するものではなく、例えば、タンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞内抗体をコードする核酸、偽(デコイ)遺伝子から選択される核酸が挙げられ、本発明においては、外来遺伝子はペクターに組み込まれていてもよい。

ベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルス ベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルベスウイルスベクター等が 挙げられる。

本発明によれば、常法に従って穿孔法によって外来遺伝子を導入した標的細胞を、細胞接着活性物質の存在下で培養することにより、該遺伝子が導入された形質転換細胞を効率よく得ることができる。細胞培養方法としては使用する細胞により、公知の方法から選択すれば良い。例えば細胞接着活性ボリベブチドの存在下で細胞培養を行う場合、培養液中に250~2000μg/mlの細胞接着活性ボリベブチドを含有させ、常法に従い培養すれば良い。

特に、細胞接着活性物質を被覆した培養器具を用いて培養するのが好ま しい。培養器具とは、通常に細胞を培養する目的に使用する器具であれば 良く、例えば、培養皿、マイクロキャリアー使用の培養器具、繊維状の中 空糸使用の培養器具である。培養器具への該物質の被覆方法としては塗布 しても良く、散布しても良い。例えば、細胞接着活性ポリペプチドの培養 器具への被覆は容易に行うことができ、該ポリペプチドを例えばリン酸緩 街生理食塩水 (PBS) のような適当な溶液に溶かし、培養器具に添加し、 適当時間静度することで培養器具にポリペプチドを被覆できる。培養器具 に被覆するポリペプチド量としては50~1000pmo1/cm²の範囲、好適には150~600pmo1の範囲より選択すれば良い。

細胞接着活性物質の存在下で培養した形質転換細胞は培養物中より常法 により得ることができ、形質転換細胞を効率よく製造することができる。 得られた形質転換細胞は、細胞の遺伝子組換え技術を用いる有用物質の 生産、疾患モデルの開発、遺伝子治療等に有用であり、本発明により、効 率よく形質転換細胞が提供される。

また、細胞接着活性物質を含有するキットを使用することにより、本発明を簡便に行うことができる。キット中に含有される細胞接着活性物質は溶液でも良く、凍結乾燥品でも良い。キット中には細胞接着活性物質の溶解、希釈用緩衝液、細胞培養培地、細胞培養器具等を含有させても良い。例えば本発明の方法に用いるポリペプチド類、ポリペプチド希釈用PBS、培養器具等をまとめてキットとしておくことにより、簡便に、形質転換細胞の製造を行うことができる。キットに含める試薬は、溶液状でも凍結乾燥物でもよい。

なお、本発明で使用する穿孔法としての、エレクトロポレーション法、 マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等は、目的に応じて適 宜選択、使用できる。

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれ ら実施例に限定されるものではない。

実施例1

1. 細胞接着活性ポリペプチドの培養皿への塗布

配列表の配列番号3で表されるポリペプチド(以下C274と称す)、 配列表の配列番号4で表されるポリペプチド(以下H296と称す)および配列表の配列番号5で表されるポリペプチド(以下C・CS1と称す) をそれぞれ $1\,\mu$ Mとなるようにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶かし、 $0.22\,\mu$ mのフィルター(マイレクスーGV、ミリポア社)を用いて滅 簡した。

これらの溶液をそれぞれ 24 穴のポリスチレン製培養皿(コーニング社製)に 1 加 1 / ウェルとなるように添加し、4 $\mathbb C$ 、一晩コートした。この培養皿は、以下に記載の形質転換細胞を添加する前に、ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地 $500\mu1$ / ウェルでリンスした。

2. 細胞の形質転換

10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地で培養したヒト 類表皮癌A-431細胞の培養皿(直径100mm)2枚分をそれぞれ1 0m1のウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地でリンスし た後、0.25%ウシ・トリプシンと0.02%EDTAを含むPBSを 3m1添加して細胞を培養皿よりはがした。これらに、それぞれ7mlの ウン胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地を加えた後、800 r pm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのウシ胎児 血清を含むダルベッコ改変最少基本培地に懸濁し800rpm、3分遠心 して細胞を集めた。得られた細胞を合せて、10mlのPBSに懸濁し、 その10分の3量を取り、二分した後、それぞれを800 rpm、3分歳 心して細胞を集めた。得られた細胞を再度、10mlのPBSに懸濁し、 800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞の一方は、無菌 的に調製されたpCAT-コントロール (control)ベクター (プロメガ社) 15μgを含む1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー(バイオラッ ド社)用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、水中で10分放置 した。もう一方の細胞は、1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー (バイオラッド社) 用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、氷中

で10分放置した。それぞれの細胞は、氷中10分放置後、250V、960μFで電圧を印加した。印加後、細胞をキュベットのまま氷中で10分放置した。この後、15mlの10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地中へ細胞を回収し、上記のポリペプチドをコートした24穴のポリスチレン製培養皿に1ml/ウエルとなるように添加した。これらの細胞を5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した後、培地をアスピレーションで除去し、新たに10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地を1ml/ウエルとなるように加え、5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。

3. 形質転換効率(遺伝子導入効率)の測定

培養した細胞は、1ウエル当り1、25m1のPBSで3回リンスし、
CATーELISAキット(ペーリンガー・マンハイム社製)を用い、本キットの使用方法に従い、細胞溶解液を調製し発現CATの検出を行った。本キットは、西洋ワサビのペルオキシダーゼ標識の2次抗体と基質として
ABTSを用いているので405mm/490mmを測定し、エレクトロポレーションの際、PCATーコントロールペクターを添加しなかったものをブランクとして用い、各区のPCATーコントロールペクターを添加したものの値からブランク値を引いた値を発現CAT量とした。

この結果を図1に示す。すなわち、図1は各ポリペプチド処理区での細胞への遺伝子導入効率を示す図であり、縦軸に無処理区、各ポリペプチド処理区が示され、横軸は405 nmの吸光度と490 nmの吸光度比で遺伝子導入効率が示されている。

図1に示すように、上記C274、H296、C・CS1処理区では無 処理の培養皿に比べて発現CAT量は高く、pCATーコントロールベク ターの細胞への導入効率が高いことが示された。

実施例2

1. 細胞接着活性ポリペプチドの培養皿への塗布

配列表の配列番号 3 で表されるポリペプチド(以下 C 2 7 4 と称す)、 配列表の配列番号 4 で表されるポリペプチド(以下 H 2 9 6 と称す)および配列表の配列番号 5 で表されるポリペプチド(以下 C · C S 1 と称す) をそれぞれ1 μMとなるようにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶かし、 0. 2 2 μmのフィルター(マイレクスーGV、ミリポア社)を用いて滅 菌した。これらの溶液をそれぞれ2 4 穴のポリスチレン製培養皿(コーニング社製)に1 m 1 / ウエルとなるように添加し、4 ℃、一晩コートした。 この培養皿は、以下に配載の形質転換細胞を添加する前に、ウシ胎児血清を含まないダルペッコ改変最少基本培地5 0 0 μ 1 / ウエルでリンスした。

2. 細胞の形質転換

10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地で培養したアフリカミドリザル腎COS-7細胞の培養皿(直径100mm)2枚分をそれぞれ10mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地でリンスした後、0.25%ウシ・トリプシンと0.02%EDTAを含むPBSを3ml添加して細胞を培養皿よりはがした。これらに、それぞれ7mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地を加えた後、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地に懸濁し800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのPBSに懸濁し、その6分の5量を取り、二分した後、それぞれを800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を、6mlのPBSに懸濁し、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞の一方は、無菌的に調製されたpCAT-コントロール(control)ベクター(プロメガ社)

15μgを含む1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー(バイオラッド社)用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、氷中で10分放置した。もう一方の細胞は、1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー(バイオラッド社)用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、氷中で10分放置した。それぞれの細胞は、氷中10分放置後、250V、960μFで電圧を印加した。印加後、細胞をキュベットのまま氷中で10分放置した。この後、15mlの10%ウン胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地中へ細胞を回収し、上配のポリペプチドをコートした24次のポリスチレン製培養皿に1ml/ウエルとなるように添加した。これらの細胞を5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した後、培地をアスピレーションで除去し、新たに10%ウン胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地を1ml/ウエルとなるように加え、5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。

3. 形質転換効率 (遺伝子導入効率) の測定

培養した細胞は、1ウエル当り1.25m1のPBSで3回リンスし、CATーELISAキット(ベーリンガー・マンハイム社製)を用い、本キットの使用方法に従い、細胞溶解液を調製し発現CATの検出を行った。本キットは、西洋ワサビのベルオキシダーゼ標識の2次抗体と基質としてABTSを用いているので405nm/490nmを測定し、エレクトロボレーションの際、PCATーコントロールベクターを添加しなかったものをブランクとして用い、各区のPCATーコントロールベクターを添加したものの値からブランク値を引いた値を発現CAT量とした。この結果を図2に示す。すなわち、図2は各ポリペプチド処理区での細胞への遺伝子導入効率を示す図であり、縦軸に無処理区、各ポリペプチド処理区が示され、横軸は405nmの吸光度と490nmの吸光度比で遺伝子導入効

WO 96/17073 PCT/JP95/02425

率が示されている。

図2に示すように、上記C274、H296、C・CS1処理区では無処理の培養皿に比べて発現CAT量は高く、pCATーコントロールペクターの細胞への導入効率が高いことが示された。

実施例3

キットの作製

下記表 2 に示すように C 2 7 4、H 2 9 6、C・C S 1、P B S および 培養皿で遺伝子導入細胞製造用キットを作製した。このうち、試薬 A、B、C はそれぞれ上記のポリペプチドをP B S にて表に示す遺度としたものを 調製した。その他は、実施例 1 に記載のものを使用した。なお、表 2 に示すキットの試薬 A、B、C および試薬希釈液は、いずれも 0.2 2 μmの 減菌フィルターで予めろ過したものを用いて、無菌的に調製した。 表 2

形質転換細胞製造用キット

試薬A・・・100μM	C 2 7 4	150μ1
試薬B・・・100μM	H 2 9 6	150μ1
試薬C・・・100μM	C · C S 1	150μl
試薬希釈液・・・PBS		4 5 m l
24穴ポリスチレン製培養		3枚

以上配載したごとく、本発明によれば、細胞への遺伝子導入を目的とする従来法の問題点を解決し、標的細胞への外来遺伝子導入効率を向上させた形質転換細胞製造方法が提供できる。また、該方法に使用する形質転換細胞製造用のキットも提供することができる。

PCT/JP95/02425

図面の簡単な説明

図1は、ヒト類表皮癌A-431細胞へのpCAT-コントロールベク ターの導入における細胞接着活性ポリペプチド処理の遺伝子導入効率に対 する効果を示すグラフである。

図2は、アフリカミドリザル暫COS-7細胞へのpCAT-コントロ ールベクターの導入における細胞接着活性ポリペプチド処理の遺伝子導入 効率に対する効果を示すグラフである。

配列の長さ:4

配列の型:アミノ酸

鎖の数:↓本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Arg Gly Asp Ser

1

配列番号:2

配列の長さ:25

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His

15

1 5 10

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

20 25

配列番号:3

配列の長さ:274

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプチド 配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg . 1 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin . 70 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly lie Asp Phe Ser Asp lie Thr Ala Ash Ser Phe Thr Val His Trp lie Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg lle Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser He Thr Leu Thr Asn Leu Thr

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser lie Val Ala Leu Asn Gly Arg

	Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
					170					175					180
	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	۷al	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
					185					190					195
	Leu	-11e	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	۷al	Thr	V a I	Arg	Tyr	Tyr	Arg
					200					205					210
	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Va l	Cln	Glu	Phe
					215					220					225
	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	Пe	Ser	Gly	Leu	Lys
					230				,	235					240
	Pro	Gly	۷al	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	۷al	Tyr	Ala	۷al	Thr	Gly	Arg
					245					250					255
	Gly	λsp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	lle	λsn	Tyr	Arg
					260					265					270
	Thr	Glu	Ιle	Asp											
配列	중号	: 4													
配列(の長	≓ ∶:	296												
配列	の型	: 7	٤ <i>)</i> ا	Ċ.											
鎖の	数:	1本	遵												
トポロ	ロジ	- : i	育館:	Ť											

Ala lle Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gin Val Thr Pro 5 10 15

配列の種類:ペプチド

配列:

1	hr	Ser	L	eu	Ser	Ala	Gln	Trp	Thr	Pro	Pro	Asn	Va I	GIA	Leu	ınr
						20					25					30
1	3 1 v	Tyr	. ,	rg	Val	Arg	Va l	Thr	Pro	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Pro	det
				,		35					40					45
	l.vs	Gli		ile	ÁSN	Leu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Ser
	-,-					50					55					60
	Civ	1.0	u	Me t	Va!	Ala	Thr	Lys	Tyr	Glu	Va l	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu
		•	-			65					70					75
	l.vs	. As	0	Thr	Lei	The	Ser	Arg	Pro	λla	Gin	Gly	Val	Val	Thr	Thr
	-,-					. 80					85					90
		. cı		124	Va			Pro	Are	Arz	Ala	Ara	Val	The	Asp	Ala
	LEE				+	99					100					105
	Th	- 61		Th	r Th			- 11	e Sei	Tro	Arg	The	Lys	The	Glu	Thr
			•		×	11				-	113					120
		. т		C I	v Ph			i As	o Ali	a Val			ı Ası	GI	Glo	Thr
	- 1					12					130					135
	0 -	• 1		 C I				e Lv	s Pr	n Asi			z Sei	r Ty	r Thi	r IIe
	F 1	u i	16	٠.	11 111	14		,	•		14					150
	TL	- c			(1			V Th	r 4s	i n Tv			e Ty	r Le	и Ту	r Thr
	t n		.,	LC		15		,			16					165
										- Pr			1 [1	e As	o Al	a Ser
	Le	u A	211	n:	יא עו	.1					. 17				-	180
													ء اء	u Al	a Th	r Th
	Ti	ır A	ı l a	. 1	18 A			0 31	EI AS	in Le	19					195
						1	85				15					

Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Tro	Gin	Pro	Pro	Arg	λla	Arg	lle
				200					205					210
Thr	Gly	Tyr	He	lle	Lys	Tyr	Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg
				215					220					225
Giu	Vai	Va I	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Gly	۷al	Thr	Glu	Ala	Thr	l·l e
				230					235					240
Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	lle	Tyr	Va I	lle	Ala
				245					250					255
Leu	Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser	Glu	Pro	Leu	l l e	Gly	Arg	Lys	Lys
				260					265					270
Thr	Asp	Glu	Leu	Pro	Gln	Leu	V a l	Thr	Leu	Pro	His	Pro	Asn	Leu
				275					280					285
His	Gly	Pro	Glu	lle	Leu	ÁSP	Va l	Pro	Ser	Thr				
				290					295					

配列の長さ:302

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asa IIe Gly Pro Asp Thr Met Arg

Val	The	rŢ	rp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	He	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
					20					25					30
Val	Ar	g T	yr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Va i	Ala	Glu	Leu
					35					40					45
Ser	11	e S	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Va l	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
					50	1				55				1	60
Pro	GI	у .	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Gļu	Gln
					65	i .				70					75
His	GI	u	Ser	The	r Pro	Let	ı Arş	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Cly	Leu	Asp
					. 80)				85	5				90
Se	r Pı	ro	Thr	.Gl	y II	e Asi	p Ph	e Se	r Asp	He	The	Ala	Asn	Ser	Phe
					9	5				100)				105
Th	r V	a l	His	s Tr	p II	e Al	a Pr	o Ar	g Ala	1 Th	r II	e Thi	Gly	Tyr	Arg
					, 11	0				115	5				120
11	e A	rg	Hi	s Hi	s Pr	o Gl	u Hi	s Ph	e Se	r Gl	y År	g Pro	Ars	Gio	ı Asp
					12					13					135
Àr	z V	a I	Pr	o Hi	s Se	r Ar	gλs	n Se	r 11	e Th	r Le	u Th	r As	n Le	u Thr
			٠.		14	10				14	5				150
Pr	o G	ily	Th	r GI	lu Ty	r Va	ıl Va	ı Se	r II	e Va	I AI	a Le	u As	n Gi	y Arg
					15	55				16	0				165
G	i lu (ilu	Se	r P	ro L	eu Le	eu (le G	ly Gl	n Cl	n Se	r Th	r Va	l Se	r Asp
					-	70				17					180
٧	al!	Pro	A	rg A	sp L	eu G	lu V	al V	al Al	a Al	la Ti	ir Pr	o Ti	ır Se	r Leu
						85					90				193

Leu	He	Ser	Trp	Asp	λla	Pro	λla	Val	Thr	۱s۷	Arg	Tyr	Tyr	Ar
				200					205					210
lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Va I	Gla	Ģlu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	V a I	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Пe	Ser	ΙΙe	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Clu	i i e	Asp	Lys	Pro	Ser	Asp	Glu	Leu	Pro	Gin	Leu	Val	Thr
				275					280					285
Leu	Pro	His	Pro	Asn	Leu	His	Gly	Pro	Glu	lle	Leu	Asp	۷al	Pro
				290					295					300
Ser	Thr													

配列の長さ:5

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Tyr lle Gly Ser Arg

1

配列の長さ:283

配列の型:アミノ酸

鎖の数: | 本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro 15 5 10 1 Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lle Asp Leu 30 25 20 Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp 40 35 Val Ala Glu Leu Ser ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu 55 50 Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser 70 65 Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys 85 80 Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly lie Asp Phe Ser Asp lie Thr 100 95 Ala Asn Ser Phe Thr Val His Tro lie Ala Pro Arz Ala Thr lie 115 110 Thr Gly Tyr Arg lle Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg 135 130 125

Pro Arg Glu As	op Arg Val Pi	o His Ser Arg A:	sn Ser ile Thr Leu
	140	145	150
Thr Asn Leu Th	r Pro Gly Th	r Glu Tyr Val Va	I Ser Ile Val Ala
	155	160	165
Leu Asn Gly Ar	g Glu Glu Se	r Pro Leu Leu 11	e Gly Gln Gln Ser
	170	175	180
Thr Val Ser Asi	Val Pro Arg	Asp Leu Glu Va	l Val Ala Ala Thr
	185	190	195
Pro Thr Ser Let	Leu lle Sei	Trp Asp Ala Pro	Ala Val Thr Val
	200	205	210
Arg Tyr Tyr Arg	lle Thr Tyr	Gly Glu Thr Gly	Gly Asn Ser Pro
	215	220	225
Val Gin Glu Phe	Thr Val Pro	Gly Ser Lys Ser	Thr Ala Thr Ile
	230	235	240
Ser Gly Leu Lys	Pro Gly Val	Asp Tyr Thr 11e	Thr Val Tyr Ala
	245	250	255
Val Thr Gly Arg	Gly Asp Ser	Pro Ala Ser Ser	Lys Pro Ile Ser
	260	265	270
lle Asn Tyr Arg	Thr Glu lle	Asp Lys Pro Ser	Cln Met
	275	280	

配列番号:8 配列の長さ:279 配列の型:アミノ酸 鎖の数:1本鎖 トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプチド 配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg - 10 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lie Aso Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 45 Ser lle Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu . 55 50 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln 70 65 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 80 85 Ser Pro Thr Gly lie Asp Phe Ser Asp lie Thr Alz Asn Ser Phe 100 95 The Val His Trp lle Ala Pro Arg Ala The lle The Gly Tyr Arg 115 110 lle Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp 125 130

145

150

Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr

140

Glu	Glu	Sei	Pro	Leu	Leu	114	- G1	v Gla		ı Sei	. Th.	V-1		
								,		1 361	ıar	Yaı	ser	Asp
				170					175					180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	۷al	٧a	l Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190)				195
Leu	ΙĮε	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	ı Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
lle	Thr	Tyr	Gly	Clu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gin	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Va l	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala		[] e	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	GIV	V a I	1 - 0	Tu -	Th.	11.								
	,		.,,		1111	116	inr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	λla	Ser	Ser	Lvs	Pro	110	Ser		١	T	
							-,.			251	116	vzu	lyr	Arg
				260					265					270
Thr	Glu	Πle	Asp	Lys	Pro	Ser	Gla	Меt						

275

記列番号:9 配列の長さ:474 配列の型:アミノ散 鎖の数:1本鎖 トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプテド 配列:

Ala	Val	Pro	Pro	Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	116	619	rro
1				5					10					15
ASP	Thr	He t	Arg	Va I	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	ile	Asp	Leu
				20					25					30
Thr	Asn	Phe	Leu	Vai	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp
				35					40					45
Val	Ala	Glu	Leu	Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	λsn	Ala	Val	Val	Leu
				50					55					60
Thr	Ásn	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Va i	Val	Ser	Val	Ser	Ser
				65					70					75
Val	Tyr	Giu	Gin	His	Giu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys
				80	ı				85	i				90
The	Gly	/ Le	u Ast	Se	Pro	The	r. Giy	He	. Ast	Phe	Ser	Asp	lle	Thr
				9	5				100)				105
'Al	a As	n Se	r Ph	e Th	r Va	l Ki:	s Tr	o II	A L	e Pro	λrg	Ala	The	lle
				11)				11	5				120
Th	r Gl	у Ту	r Ar	g II	e Ar	g Hi	s Hi	s Pr	o G I	u Hi:	s Phe	Sei	r Gli	/ Arg
				12	5				13	0			•	135
Pr	o Ar	g Gi	u As	p Ar	g Va	i Pr	o Hi	s Se	r Ar	z As	n Se	r III	e Th	r Leu
				14	0				14	5				150
Th	r As	n Le	u Th	r Pr	o ,G i	y Th	r Gi	и Ту	r Va	l Va	i Se	r II	e Va	l Ala
				15	5				16	0				165
Le	u As	n Gi	y Ar	g Gl	u G1	u Se	r Pr	o Le	u Le	ull	e Gl	y Gl	n Gl	n Sei
				17	0				17	5				180

WO 96/17073 PCT/JF95/02425

Thr	Val	Ser	YZD	۷a۱	Pro	Arg	YZD	Leu	Glu	∀a i	Val	Ala	Ala	Thr
		-		185					190					195
Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val
				200					205					210
Arg	Tyr	Tyr	Arg	lle	Thr	Tyr	Giy	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro
				215					220					225
۷al	Gla	Glu	Phe	Thr	Vai	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	ile
				230					235					240
Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	۷al	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala
				245					250					255
Val	Thr	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser
				260					265					270
ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Clu	Tle	Asp	Lys	Pro	Ser	Gln	Asn	Gİu	Gly
				275					280					285
Leu	Asn	Gin	Pro	Thr	Asp	Asp	Ser	Cys	Phe	Asp	Pro	Tyr	Thr	Vai
				290					295					300
Ser	His	Tyr	Ala	Val	Gly	λsp	Glu	Trp	Glu	Årg	Met	Ser	Glu	Ser
				305					310					315
Gly	Phe	Lys	Leu	Leu	Cys	Gin	Cys	Leu	Gly	Phe	Gly	Ser	Gly	His
				320					325					330
Phe	Arg	Cys	λsp	Ser	Ser	Arg	Trp	Cys	His	Asp	Asn	Gly	Val	Asa
				335					340					345
Tyr	Lys	116	Gly	Glu	L7s	Trp	Asp	Arg	Gln	Gly	Glu	λsn	Gly	Gin
				350					355					360

Меt	Меt	Ser	Cys	Thr	Cys	Leu	Gly	Αsα	Gly	Lys	Gly	Glu	Phe	Ĺys
				365					370					375
Cys	Asp	Pro	His	Glu	Ala	Thr	Cys	Tyr	Asp	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr
				380					385					390
His	Val	Gly	Glu	Gin	Trp	Gin	Lys	Glu	Tyr	Leu	Gly	Ala	l l e	Cys
				395					400					405
Ser	Cys	Thr	Cys	Phe	Gly	Gly	Gin	Årg	Gly	Trp	Arg	Cys	Asp	Asn
				410					415					420
Cys	Arg	Arg	Pro	Gly	Gly	Glu	Pro	Ser	Pro	Glu	Gly	Thr	Thr	Gly
				425					430					435
Gli	ı Sei	r Tyı	Asn	G Ln	Tyr	Ser	Gin	Arg	Tyr	Нis	Gin	Arg	The	Asn
				440					445					450
Th	Ası	n Va	i Asr	Cys	Pro	lle	Glu	Cys	Phe	Met	Pro	Leu	Asp	Vai
				455					460					465
GI	n Al	a As	p Arg	g G I t	ı Ası	Ser	r Arg	Glu						
				470										

配列の長さ:385

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

λla	Pro	lle	۷al	Asn	Lys	Vai	Val	Thr	Pro	Leu	Ser	Pro	Pro	Thr	
1				5					10					15	
Asn	Leu	His	Leu	Glu	Ala	λsn	Pro	Asp	Thr	Gly	۷al	Leu	Thr	Val	
				20					25					30	
Ser	Trp	Glu	λrg	Ser	Thr	Thr	Pro	Asp	ίlε	Thr	Gly	Tyr	Arg	lle	
	•			35					40					45	
Thr	Thr	Thr	Pro	Thr	Asn	Gly	Gin	Gla	Gly	Asn	Ser	Leu	Giu	Clu	
				50					55					60	
Val	Val	His	λla	Asp	Gin	Ser	Ser	Cys	Thr	Phe	Asp	Asn	Leu	Ser	
				65					70					75	
Pro	Gly	Ĺeu	Glu	Tyr	λsα	Val	Ser	Va i	Tyr	Thr	Val	Lys	Asp	Asp	٠,
				80					85					90	
Lys	Glu	Ser	۷al	Pro	lle	Ser	Asp	Thr	lle	lle	Pro	Ala	۷ai	Pro	
				95					100					105	
Pro	Pro	Thr	Asp	Leu	λrg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	
				110					115					120	
Arg	۷al	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	! le	Asp	Leu	Thr	λsn	Phe	
				125					130					135	
Leu	Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Vai	Lys	Asn	Giu	Glu	λsp	۷ai	Ala	Glu	
				140					145					150	
Leu	Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	۷ai	Leu	Thr	Αsπ	Leu	
				155					160					165	
Leu	Pro	Giy	Thr	Glu	Tyr	Vai	Vai	Ser	Val	Ser	Ser	Vai	Tyr	Glu	
				170					175					180	

Gla	His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu
				185					190					195
Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser
				200					205					210
Phe	Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr
				215					220					225
Arg	[] e	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arz	Pro	λrg	Glu
				230					235					240
Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu
				245					250					255
Thr	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	۷a۱	Val	Ser	lle	۷al	Ala	Ĺeu	Asn	Gly
				260					265					270
Arg	Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gin	Gln	Ser	Thr	Val	Ser
				275					280					285
Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	۷a۱	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	
				290					295					300
Leu	Leu	ılle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	۷a۱	Thr	Val	λrş	Tyr	
				305					310					315
Arg	ile	The	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Cly			Pro	۷al	Gla	
				320					325					330
Phe	The	r Va	Pro			Lys	Ser	Thr			ile	Ser	Gly	
				333					340					343
Lys	. Pro	GI	y Va			The	· Ile	Thr			Ala	Val	Thr	
				350)				355	5				360

Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro I le Ser I le Asn Tyr 365 370 375 Arg Thr Glu I le Asp Lys Pro Ser Gln Met 380 385 配列春号:11

配列の長さ:549 配列の型:アミノ酸 鎖の数:1本鎖 トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプチド

配列:

 Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn I le Gly Pro Asp Thr Met Arg

 1
 5
 10
 15

 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser [le Asp Leu Thr Asn Phe Leu 20
 25
 30

 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Clu Leu 35
 40
 45

 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Eu 50
 55
 60

 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Cin 65
 70
 75

 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 80
 85
 90

Ser	Pro	Thr	Gly	He	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Vai	His	Trp	He	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	He	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
11e	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Va I	Va i	Ser	Пe	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Glu	ı Se	Pro	Leu	Lei	ılle	Gly	Gln	Gin	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170)				175	i			-	180
۷a	l Pro	o Ar	g Asp	Leu	Gl	u Va	l ,∀a l	Ala	Ala	The	Pro	The	Ser	Leu
				185					190					195
Le	u II	e Se	r Tr	p As	A l	a Pr	o Ál	a Val	Th	r Va	l Ar	g Ty	r Tyl	Arg
				200)				205	:				210
11	e Th	r Ty	r Gl	y Gli	ı Th	r GI:	y GI	Asn	Ser	Pro	Va!	Gli	ı Glu	?he
				213	5				220)				225
Th	r Va	l Pr	o GI:	y Se	r Ly	s Se	Th	rλla	The	- 116	Sei	GL	Lei	Lys
٠				230)				235	5				240
Pr	o G I	y Va	l As	рТу	r Th	r (Î	e Th	r Val	Ту	Ala	y Va	Th	r GI:	Arg
				24	5				250)				255
GI	y As	p Se	r Pr	o Ai	a Se	r Se	ř Ly:	s Pro	110	Se	r Ili	e Ası	ту	r Arg
				26	0				263	5				270

-														
Th	r GI	u ii	e yst			Se	r Me	t Ala	a iie	Pre	λi	a Pro	Th.	r Asp
				275					280					285
Let	ı Ly:	s Ph	e Thr	Gla	Va!	Th	Pro	The	r Sei	Let	ı Se	r Ala	Gia	1 Trp
				290					295					300
The	Pro	Pro	Asn	Val	Gla	Leu	The	Gly	туг	Arg	٧a	l Arg	Val	Thr
				305					310					315
Pro	Lys	Glo	Lys	Thr	Gly	Pro	llet	Lys	Glu	l l e	: Ası	ı Leu	Ala	Pro
				320					325					330
Asp	Ser	Ser	Ser	Vai	Val	Vai	Ser	Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	
				335					340					345
Tyr	Glu	Yai	Ser	Yai	Tyr	Ala	Leu	Lys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg
				350			*		355					360
Pro	Ala	Gin	Gly	Vai	Vai	Thr	Thr	Leu	Glu	Asn	Val	Ser	Pro	
				365					370					375
Arg	Arg	Ala	Arg	Va i	Thr	Asp	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	ile	Thr	
				380					385					390
Ser	Trp	Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr	lle	Thr	Gly	Phe	Cin	Vai	
				395					400					405
Ala	Vai	Pro	Ala	Asn	Gly	Gln	Thr	Pro	l le	Gln	Arg	Thr	He	
	•			410					415		•			420
Pro	Asp	Va i	Arg	Ser	Tyr	Thr	lle	Thr	Giv	Leu	Cin	Pro	Clv	
				425					430		•			435
λsp	Туқ	Lys	lle	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Lev		Aso	450	Ala		
				440		•			445					3e: 450
														730

PCT/JP95/02/25

Ser	Pro	Va!	Val	lle	λsp	λla	Ser	Thr	Ala	He	λsp	λla	Pro	Ser
				455					460					465
Asn	Leu	Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	λsn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser
				470					475					480
Trp	Gln	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	lle	Thr	Gly	Tyr	lle	lle	Lys	Tyr
				485					490					495
Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Glu	Val	Val	Pro	Arg	Pro	γιβ
				500					505					510
Pro	Gly	, Val	Thr	Gíu	λla	Thr	- ile	Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr
				515					520					525
Glu	ı Ty	r Thi	r Ile	Tyr	· Val	111	a Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser
				530					535					540
GI	u Pr	o Le	u Tle	e Gl	Ar:	g Ly	s Ly:	s Th						
				54										

配列番号:12

配列の長さ:422

配列の型:アミノ数

|鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arz Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arz
1 5 10 15

11		_													
٧a	I Th	r Tr	p Al	a Pr	o Pr	o Pr	o Se	r II	e As	sp Le	u Ti	hr A	sn Pi	ne Le	U
				20	1				2	5				30	
۷a۱	Arg	Tyr	Ser	Pro	۷al	Lys	Asn	Glu	Glo	ı Asp	٧a	LAI	Gle	. Leu	
				35					40					45	
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	λsn	Ala	۷ai	٧ai	Leu	Th	r Asi	ı Let	Leu	
				50					55					60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	۷al	۷al	Ser	Val	Ser	Ser	۷a	Tvr	· Gin	Gin	
				65					70			,.		75	
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Glo	Lys	Thr	Civ	Leu		
				80				·	85		••••	٠.,	5.0	90	
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asa		Thr	á I a	4-0	500		
				95				,	100		714	ns:	JEI	105	
Thr	Val	His	Trp	lle	Ála	Pro	Aro	412		lle	Th-	C1	T		
				110					115			017	171	120	
lie	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Pha	Sar		Arg			٠.		
				125				JEI	130	AIS	710	YLZ	610		
Arg	Val	Pro	His		ira	4 = 0	505	110		Leu	T L .			135	
				140	A1 &	W211	361	118		Leu	iar	ΥZU	Leu		
Pro	GIV	The	C1.		Val	Val	٠		145					150	
	.,	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		155	141	rai	361	11e		Ala	Leu	Asn	Gly		
C I	C Lu	٠	0		1		۵.		160	_				165	
U I U	UIU	351	110		rea	116	GIY	GIN		Ser	Thr	Va!	Ser		
V - 1	D	١		170	C 1.				175	1				180	
141		wig	ASD		G I U	۱s۷	vai	Ala		Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	
				185					190					195	

Leu	Lie	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	λla	Val	Thr	۷al	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
l le	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gin	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	۷a	Asp	T.yr	·Thr	lie	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245		,			250					255
Gly	λsp	Se	r Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	Tle	Asn	Tyr	Arg
				260)				265					270
The	Gla	ıll	e Asi	p Lys	Pro	Sei	Мet	Ala	Asn	Glu	Gly	Leu	Asn	Gln
				275	5				280	1				285
Pro	Th	r As	p As	p Se	Cys	s Pho	a Asp	Pro	Tyr	Thr	Val	Ser	His	Tyr
				29	0				295	i				300
Al	a Va	l GI	y As	p _. Gl	u Tri	p G l	u-Arg	g Met	Sei	Gli	Se	r G i y	Phe	Lys
				30					310					315
Le	u Le	u C	rs Gl	n Cy	s Le	u Gi	y Ph	e Gi	Se:	Gi	y Hi:	s Phe	λr;	g Cys
				32					32					330
λs	p Se	r S	er Ar	g Tr	р Су	s Hi	s As	p As	n GI	y Va	l As	п Ту	r Ly	sile
				33					34					345
GI	y G	iu L	ys Tı	rp As	p Ar	g G i	n Gl	y Gi	u As	n Gl	y Gl	и Же	t Ne	i Se:
				35					35					360
C	s, T	hr C	ys L	eu G	ly As	n G	y Ly	's GI	y Gl	u Ph	e Ly	s Cy	s As	p Pro
				30	65				37	0				37

	His	Glu	Ala	Thr	Cys	Tyr	Asp	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	His	Val	Gly
					380					385					390
	Glu	Gln	Trp	Gin	Lys	Glu	Tyr	Leu	Gly	Ala	lle	Cys	Ser	Cys	Thr
					395					400					405
	Cys	Phe	Gly	Gly	Gln	Arg	Gly	Trp	Arg	Cys	Asp	Àsn	Cys	Arg	Arg
					410					415					420
	Pro	Gly													
配列	똶号	: 13													
配列	の長	;	332												
配列	の型	: 7	ミノ	酸											
鎖の	数:	1 本	鏈												
卜ポ	ロジ	- :	直鎖	Ħ											
配列	の種	Œ:	ペプ	チド					•	٠					
配列	:														
	Pro	Thr	λsp	Leu	Arg	Phe	Tar	Asn	lle	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
	· 1				5					10					15
	۷a۱	Thr	îrp	λla	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
					20					25					30
	۷al	Arg	Tyr	Ser	Pro	Yal	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	۷al	Ala	Glu	Leu
					35					40					45
	Ser	ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asa	Ala	Val	۷al	Leu	Thr	λsn	Leu	Ĺeu
					50					55					60
	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	۷al	Val	Ser	Val	Ser	Ser	۷a۱	Tyr	Glu	Gln
					65					70					75

1	His	GĮ	u	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gia	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
						80					85					90
	Ser	Pr	0	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
						95					100					105
	Thr	۷a	i	His	Trp	He	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
						110					115					120
	lle	Ar	g	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
						125					130					135
	Arg	٧z	ı	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	He	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
						140					145					150
	Pro	Ğ	ij	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Va l	Ala	Leu	Asn	Gly	Årg
						155					160					165
	Glu	G	l u	Ser	Pro	Leu	Leu	ille	Gly	Gin	Gin	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
						170					175	i				180
	۷a	P	ro	λrg	Asp	Leu	Glo	Val	Val	Ala	Ala	The	Pro	Thr	Ser	Leu
						185	i				190)				195
	Le	u l	le	Sei	r Trp) Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Туп	Туп	Arg
						200)				205	i				210
	11	e T	hr	Ty	r Gly	Glo	Th	Gis	Glý	Asn	Ser	Pro	'Val	Glr	Glo	, Phe
						215	5				220)				225
	Th	r V	al	Pr	o Gli	/ Sei	ty:	s Sei	Thr	Ala	The	: He	S e i	Gly	Lei	ı Lys
						230)				23	5				240
	Pr	0 0	ij	y Va	l As	рТу	r Th	r H	e Thr	· Val	Ty	r Ala	ı Va	(-Th	r GI:	, Arg
						243	5				250)				255

Gĺy	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	ile	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Glu	lle	Ÿ2D	Lys	Pro	Ser	Met	Ala	Asn	Ser	λsp	Ser	Glu	Cys
				275					280					285
Pro	Leu	Ser	His	Asp	Gly	Tyr	Cys	Leu	His	Asp	Gly	Va I	Cys	Met
				290					295					300
Tyr	lle	Glu	Ala	Leu	Asp	Lys	Tyr	Ala	Cys	Asn	Cys	۷ai	Val	Gly
				305					310					315
Tyr	lle	Gly	Glu	Arg	Cys	Gļn	Tyr	Arg	Asp	Leu	Lys	Trp	Trp	Glu
				320					325					330
Leu	Arg													

配列番号:14

配列の長さ:341 配列の型:アミノ数 鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプチド

配列:

 Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

 1
 5
 10
 15

 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20
 25
 30

 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 ...
 ...

35 40 45

Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	λsπ	λla	Val	۷al	Leu	Thr	λsπ	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Va l	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	۷al	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	ile	Thr	Gly	Tyr	λrg
				110					115					120
He	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130	i				135
Arg	y Va	l Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	- (le	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145	i				150
Pro	Gl	y Th	r Gli	туг	Val	Val	Ser	lle	· Val	λla	Leu	ı Asn	Gly	λrg
				155	5				160)				165
Gl	u Gl	u Se	r Pro	Let	, Leu	ı (le	e Gly	y Gla	Gli	ı Ser	Thr	s¥.	Ser	YZD
				170)				179	5				180
۷a	l Pr	o Ar	g Ás	p Lei	u Gli	υVa	l Va	1 Ala	a Ali	a Thi	r Pro	Th	r Šei	r Leu
				18	5				19	0 _				195
Le	u 11	e Se	r Tr	p As	p Ala	a Pr	o Al	a Va	l Th	r Va	l Ar	g Ty	r Ty	r Arg
				20	0				20	5				210
11	e Ti	ır Ty	r Gi	y Gi	u Th	r Gl	y Gl	y As	n Se	r Pr	o Va	1 G1	n Gl	u Phe
				21	5				22	0				225

Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	The	ile	Ser	Gly	Leu	Ĺÿ
				230					235					24
Pro	Gly	Val	λsp	Tyr	Thr	ile	Thr	۷al	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Ar
				245					250					25
Gly	λsp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	ile	Ser	lle	λsn	Tyr	λει
				260					255					270
Thr	Glu	lle	λsp	Lys	Pro	Ser	Met	Gly	ile	Tyr	ile	Ser	Gly	Mei
				275					280					285
Ala	Pro	Arg	Pro	Ser	Leu	Thr	Lys	Lys	Gln	Arg	Phe	Arg	His	Arg
				290					295					300
Asn	Arg	Lys	Gly	Tyr	Arg	Ser	Gln	Arg	Gly	His	Ser	Arg	Gly	Arg
				305					310					315
Asn	Gla	Asn	Ser	Arg	Arg	Pro	Ser	Arg	Ala	lle t	Trp	Leu	Ser	Leu
				320					325					330
Phe	Ser	Ser	Lys	Asn	Ser	Ser	Ser	۷al	Pro	λla				
				335					340					

配列番号:15

配列の長さ:446

記列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

P	ro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	ile	Gly	Pro	Asp	Thr	He t	Arg
	ı				5					10					15
٧	a I	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
					20		,			25					30
٧	a l	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	۷al	Ala	Glu	Leu
					35					40					45
S	er	l l e	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Vai	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
					50					55					60
P	ro	Gly	Thr	Glu	Tyr	V a l	V a l	Ser	۷al	Ser	Ser	۷al	Туr	Glu	Gln
					65					70					75
H	i s	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arz	Gly	Arg	Gla	Lys	Thr	Gly	Leu	λsp
					80					85					90
S	er	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	l l e	Thr	Ala	λsn	Ser	Phe
					95					100					105
T	hr	۷al	His	Trp	lle	Аlа	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	λrg
					110					115					120
1	le	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	YLS	P,ro	λrg	Glu	Asp
					125					130					135
i	lr3	sV	l Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	The	ieu	The	Asn	Leu	Thr
					140					145	i				150
1	Pro	Gl	y Th	r Gl	ı Tyr	Val	Val	Ser	lle	Ya1	Ala	i Lei	ı Ası	. G L y	
					155					160					163
	Gli	ı G _i l	u Se	r Pŗ	o Lev	Leu	110	Gli	Glr	Glo	1 Se	r The	r Va	Ser	
					170)				175	5				180

۷a۱	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	۷a	.Val	Ala	Ala	a Th	r Pro	Th	r Se	r Le
				185					190					19
Leu	lle	Ser	Trp	λsp	Ala	Pro	Ala	Val	Thi	r Vai	Arg	Ту	r Ty	r Ar
				200					205					210
Ιle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gli	n Gl	u Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Le	u Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	۷al	Tyr	Ala	۷al	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	λla	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	lle	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Glu	[le	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Val	Pro	Gly	Phe	Lys	Gly	Asp
				275					280					285
Met	Gly	Leu	Lys	G I 7	γsρ	Arg	Gly	Glu	Va l	Gly	Gln	I l e	Gly	Pro
				290					295					300
Arg	Gly	Xxx	γsb	Gly	Pro	Glu	Gly	Pro	Lys	Gly	Arg	Ala	Gly	Pro
				305					310					315
Thr	Gly	Αsp	Pro		Pro	Ser	Gly	Gln	Ala	Gly	Glu	Lys	Gly	Lys
				320					325					330
Leu	Gly	Val	Pro		Leu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Gly	Arg	Gln	Gly	210
				335					340					345
Lys	Gly	Ser	Thr	Gly	Phe	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Ala	Asn	Giy	Glu
				350					355					360

Lys	C I y	Ala	Arg	Gly	Val	Ala	Cly	Lys	Pro	Gly	Pro	Arg	Cly	Gla	
				365					370					375	
Arg	Gly	Pro	Thr	Cly	Pro	Arg	Cly	Ser	Arg	Gly	Ala	Arz	Gly	Pro	
				380					385					390	
Thr	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Thr	Ser	Gly	Gly	Asp	Gly	Pro	
				395					400					405	
Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Arg	Cly	Pro	Gin	Gly	Pro	Gln	Cly	Pro	
			٠.	410					415					420	
Val	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Lys	Cly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Arg	
				425	*				430					435	
Met	Gly	Cys	Pro	Gly	His	Pro	Gly	Gin	Arg	Gly					
				440					445						
	,														

配列番号:16 配列の長さ:457 配列の型:アミノ酸 鎖の数:1 本鎖

トポロジー: 直鎖状 配列の種類: ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lie Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20

Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Vai	Ĺys	Asn	Glu	Glu	Asp	۷aί	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	Ιlε	Ser	Pro	Ser	Asp	λsn	Ala	۷al	۷al	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	۷al	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gin
				65					70		-	-		75
His	Giu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gin	Lys	Thr	Giy	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	He	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	۷a۱	His	Trp	lie	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	He	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
[e	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	۷a۱	Val	Ser	lle	۷al	Аlа	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Gʻl u	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	۷a۱	Ser	Asp
				170					175					180
Vai	Pro	Arz	Asp	Leu	Glu	۷al	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	۷al	Arg	îyr	Tyr	Arg
				200					205					210

ile	Tit	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asa	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	l l e	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	۷al	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Vai	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	λla	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	lle	λsn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Glu	ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg
				275	i				280				•	285
Ala	Arg	Val	Thr	λsp	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	iie	Thr	lle	Ser	Trp
				290)				295					300
Ar	3 The	Ly	s The	r Glu	Th	116	e The	Gly	Phe	Glo	\ Va	l Ass	λla	l Val
				305					310					315
Pr	o Ala	a As	n Gl	y Gl	n Th	r Pr	0 11	e Glr	Arg	The	111	e Ly:	Pro	Asp
				32					325					330
۷a	l Ar	g Se	r Ty	r Th	r 11	e Th	r Gl	y Lei	Gli	Pre	o GI	y Th	r Ası	y Tyr
				33					34					345
Ly	s 11	e Ty	r Le	u Ty	r Th	r. Le	υλs	n As			a Ar	g Se	r Se	r Pro
				35					35					360
٧a	ıl ∀a	1 11	e As	ρλl	a Se	r Th	r Al	a [l			a Pr	o Se	r As	n Leu
				36					37				-	375
Aı	g Pr	e L	eu Al			r Pr	ro As	in Se			u Va	ı i Se	r Tr	p Gli
				38	30				38	5				390

Pro Pro Arg Ala Arz lle Thr Gly Tyr lle lle Lys Tyr Glu Lys
395 400 405

Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arz Pro Arg Pro Gly
410 415 420

Val Thr Glu Ala Thr lle Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr
425 430 435

Thr lle Tyr Val lle Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro
440 445 450

Leu lle Gly Arg Lys Lys Thr

配列番号:17

配列の長さ:368

配列の型:アミノ酸

- 鎖の数:1 本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

 Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn I le Gly Pro Asp Thr Met Arg

 1
 5
 10
 15

 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser I le Asp Leu Thr Asn Phe Leu

 20
 25
 30

 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

 35
 40
 45

Ser	ile	Se	r	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	۷al	۷al	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
					50					55					60
Pro	Gly	T	hr	Glu	Tyr	Va l	Vat	Ser	Val	Ser	Ser	Vai	Tyr	Glu	Gln
					65					70					75
His	Glo	S	er	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
					80					85					90
Ser	Pr	o T	hr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	He	Thr	λla	λsπ	Ser	Phe
					95					100					105
Thr	٧a	l H	lis	Trp	He	Ala	Pro	λrg	Ala	The	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
					110					115					120
He	Ar	g F	lis	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
					125					130					135
λr	g Va	1 1	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
					140)				145					150
Pr	o GI	y	Thr	Glo	ı Ty:	٧a	Val	Sei	· Ile	Val	Ala	Leu	Ast	Gly	Arz
					15	5				160					165
Gl	u G	lu	Ser	Pr	o Lei	ı Le	u - 116	Gly	Gln	Gla	Ser	The	Val	Ser	Asp
					170	0				175	i				180
۷a	1 ?	ro	Arg	z As	p Le	u Gl	u Va	l Va	l Ala	ιλla	Th	Pro	Th	r Sei	Leu
				,	18					190					195
Le	u l	le	Se	r Tr	p As	p Al	a Pr	o Al	a Va	The	r Va	l Ar	g Ty	r Ty:	Arg
					20					203					210
11	e T	àr	ТУ	r Gl	y Gl	u Th	r Gl	7 GI	y As			o Va	l GI	n Gl	u Phe
					21	5				22	0				225

Thr	Val	Pro	Giy	Ser	Ĺys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Vai	Asp	Tyr	Thr	lie	Thr	Val	Tyr	Ala	Vai	Thr	Giy	Arg
				245					250					255
Giy	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ιle	Ser	lie	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Glu	He	Asp	Lys	Pro	Ser	Mei	Ala	lle	λsp	Ala	Pro	Ser	Asn
				275					280					285
Leu	λrg	Phe	Leu		Thr	Thr	Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Va I	Ser	Trp
				290					295					300
Gin	Pro	Pro	Arg		Arg	lle	Thr	Giy	Tyr	lie	He	Lys	Tyr	Glu
	_			305					310					315
Lys	Pro	Gly	Ser		Pro	Arg	Giu	Val		Pro	λrg	Pro	Arg	Pro
				320					325					330
Gly	Val	Thr	Glu		Thr	lle	Thr	Gly		Glu	Pro	Gly	Thr	Glu
_	٠.		_	335					340					345
lyr	ınr	He	Tyr		lle	Ala	Leu			Asn	Gln	Lys	Ser	Glu
0		11.		350					355					360
rro	150	116	uly	Arg 365	LYS	LYS	Thr							
				.10.3										

配列香号:18

配列の長さ:367

配列の型:アミノ酸

鎖の数:|本鎖

トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプチド

配列:

ro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	lie	Gly	Pro	Asp	Thr	Ыet	Arg
1				5					10					15
/al	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Ásn	Glu	Glu	Asp	Vai	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	۷al	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Va I	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gin	Lys	Thr	Gly	Leu	λsp
				80					85					90
Ser	Pro	The	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	λsp	lle	Thr	Ala	λsπ	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	٧a	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	l!e	Thr	Gly	Tyr	Arz
				110					115					120
116	Ar	g Hi	s His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				123	i				130					135
Ar	y 4a	i Pr	o Hi:	s Se	r Arg	λsi	ı Sei	ile	Thr	Leu	The	Asn	Leu	Thr
				140)				145	i				150
Pr	o GI	y Th	r Gl	и Ту	r Va	l Va	l Se	r lie	Val	Ala	Leu	ı Asr	Gly	Arg
				15	5				160)				165

ulu	GIU	ser	770	reu	reu	116	Gly	GIA	Gin	Ser	Thr	Va i	Ser	λsp
				170					175					180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Giu	Va l	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	Asp	λſa	Pro	Ala	Val	Thr	Va I	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Giy	λsn	Ser	Pro	Vai	Gln	Gíu	Phe
				215					220					225
Thr	Vai	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Giy	Va!	Asp	Tyr	Thr	ile	Thr	۷al	Tyr	Aia	.Va i	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	ile	Ser	He	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Giu	lle	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Asn	۷aí	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg
				275					280					285
Ala	Arg	٧aί	Thr	Asp	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	l l e	Thr	ile	Ser	Trp
				290					295					300
Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr	lle	Thr	Gly	Phe	Gín	Vai	λsp	Ala	۷a۱
				305					310					315
Pro	λia	λsπ	Glÿ		Thr	Pro	ile	Gin	Arg	Thr	i i e	Lys	Pro	λsp
				320					325					330
۷a۱	Arg	Ser	Tyr		i i e	Thr	Gly	Leu	Gin	Pro	Gly	Thr	λsp	Туг
				335					340					345

Lys lie Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Aso Asn Ala Arg Ser Ser Pro 350 355 360

Val Val lie Asp Ala Ser Thr

365

配列番号:19 配列の長さ:464

配列の型:アミノ酸

鎖の数:↓本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg . 5 10 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lle Asp Leu Thr Asn Phe Leu 20 25 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 40 35 Ser lie Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 55 50 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln 75 70 65 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gla Lys Thr Gly Leu Asp 90 80 85

Ser	Pro	Thr	Gly	He	λsp	Phe	Ser	λsp	lle	Thr	λla	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	The	He	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
He	۸rg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Ásp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	λrg	λsn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					i50
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	۷a۱	۷a۱	Ser	lle	V a !	Ala	Leu	Asn	Gly	λrg
				155					160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	He	Gly	G I n	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175					180
۷al	Pro	Arg	λsp	Leu	Glu	۷al	Val	Ala	λla	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp		Ala	Pro	Ala	Va!	Thr	Va1	λrg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
lie	Thr	Tyr	Gly		Thr	Gly	Gly	nzk	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	?he
				215					220					225
Thr	۷a۱	Pro	Gly		Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	11e	Ser	Giy	Leu	Ĺys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp		Thr	11e	Thr	Va I	Tyr	Ala	V a l	Thr	Gly	Arg
			_	245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro		Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	He	λsn	Tyr	Arg
				260					265					270

Thr	Giu	lle	Asp	Lys	Pro	Ser	₩et	Gly	i le	Arg	Gly	Leu	Lys	Gly
				275					280					285
Thr	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Glü	Asp	Gly	Phe	Pro	Gíy	Phe	Lys	Gly
				290					295					300
Asp	₩et	Gly	lle	Ĺys	Gly	Asp	Arg	Gly	Glu	lle	Gly	Pro	Pro	Gly
				305					310					315
Pro	Arg	Gly	Ġlu	Asp	Gly	Pro	Glu	Gly	Pro	Lys	Gly	Arg	Gly	Gly
				320					325					330
Pro	Asn	Gly	Asp	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly
				335					340					345
Lys	Leu	G.i y	Vai	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Gly	Arg	Gln	Gly
				350					355					360
Pro	Lys	Gly	Ser	lle	Gly	Phe	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Ala	Asn	Gly
		÷		365				٠.	370					375
Glu	Lys	Gly	Gly	.Arg	Gly	Thr	Pro	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Arg	
				380					385					390
	ı Arş	GI	Pro	Thr	Gly	Pro	Arg	Gly	Glu	Arg	Gly	Pro	Arg	
9				395					400					405
11	e Th	GI	y iys	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	λsn	Ser	Gly	Gly	Asp	
				410					415					420
Pr	o Al	a Gl	y Pro	o Pro	Gli	, Glu	ı Arş	Gly			Gly	Pro	Glo	Gly
				423					430				_	435
Pr	o. Th	r G1	y Ph	e Pro	GI	y Pro	o Ly:	s Gly			Gly	Pro	Pro	Gly
				440	0				445	5				450

Lys Asp Gly Leu Pro Gly His Pro Gly Gln Arg Gly Glu Thr 455 460

配列番号:20

配列の長さ:432

配列の型:アミノ酸 鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg - 1 10 5 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lie Asp Leu Thr Asn Phe Leu 20 25 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 35 40 Ser lie Ser Pro Ser Asp Asa Ala Val Val Leu Thr Asa Leu Leu 50 55 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin 65 70 75 His Glu Ser The Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys The Gly Leu Asp 80 85 Ser Pro Thr Gly lie Asp Phe Ser Asp lie Thr Ala Asa Ser Phe 95 100 105

Thr Val His Tro II	e Ala Pro Arg Ala Ti	hr lie Thr Gly Tyr Arg	
11		15 120	
lle Are His His Pr	o Glu His Phe Ser G	ly Arg.Pro Arg Glu Asp	
12		30 135	
Are Val Pro His Se	er Arg Asn Ser lie T	hr Leu Thr Asn Leu Thr	
14		45 150	
Pro Gly Thr Glu T	r Val Val Ser lie V	al Ala Leu Asn Gly Arg	
		60 165	
Giu Giu Ser Pro L	eu Leu lie Giy Gin (In Ser Thr Val Ser Asp	
		175 180	
Val Pro Arg Asp L	eu Giu Val Vai Ala	Ala Thr Pro Thr Ser Leu	1
		190 195	
Leu ile Ser Trp A	sp Ala Pro Ala Val	Thr Val Arg Tyr Tyr Arg	3
2	200	205 210	0
lle Thr Tyr Gly	Clu Thr Cly Gly Asn	Ser Pro Val Gin Giu Pho	е
		220 22	
Thr Val Pro Gly	Ser Lys Ser Thr Ala	Thr lie Ser Gly Leu Ly	s
		235 24	
Pro Gly Val Asp	Tyr The lie The Val	Tyr Ala Val Thr Gly Ar	
	-10	250 25	
Gly Asp Ser Pro	Ala Ser Ser Lys Pro	lle Ser lle Asn Tyr Ar	
	260	265 27	
Thr Glu lle Asp	Lys Pro Ser Met Ala	Ala Gly Ser lie Thr Th	
	275	280 28	5

Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	λla	Phe	Pro	Pro
				290					295					300
Giy	His	Phe	Lys	Asp	Pro	Lys	Arg	Leu	Tyr	Cys	Lys	Asn	Gly	Gly
				305					310					315
Phe	Phe	Leu	Arg	ile	His	Pro	Asp	Gly	Yıs	Val	Asp	Gly	Val	λrg
				320					325					330
Glu	Lys	Ser	Asp	Pro	His	lle	Lys	Leu	Gln	Leu	Gln	Ala	Glu	Glu
				335					340					345
Arg	Gly	Val	V a l	Ser	lle	Lys	Gly	Va I	Cys	Ala	Asn	Arg	Tyr	Leu
				350					355					360
λla	lle t	Lys	Glu	Asp	Gly	λrg	Leu	Leu	Ala	Ser	Lys	Cys	Val	Thr
				365					370					375
Asp	Glu	Cys	Phe	Phe	Phe	Glu	Arg	Leu	Glu	Ser	Asn	Asn	Tyr	Àsa
				380					385					390
Thr	Tyr	Arg	Ser	Arg	Lys	Tyr	Thr	Ser	Tro	Tyr	Va l	Ala	Leu	Lys
				395					400					405
λrg	Thr	Gly	Gln	Tyr	Lys	Leu	Gly	Ser	Lys	Thr	Gly	Pro	Gly	Gln
				410					415					420
Lys	Ala	lle	Leu	Phe	Leu	Pro	Met	Ser	Ala	Lys	Ser			
				425					430					

配列番号:21

配列の長さ:574 配列の型:アミノ酸

鎖の数:し本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

•															
Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	λsn	ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	λrg	
1				5					10					15	
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	ile	λsp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu	
				20					25					30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	λla	Glu	Leu	
				35					40					45	
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Va!	Va!	Leu	Thr	Asa	Leu	Leu	
				50					55					60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Vai	Va!	Ser	Val	Ser	Ser	Va l	Tyr	Glu	Gln	
				65			17		70					75	
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp	
				80			l.		85					90	
Ser	Pro	The	r Gly	He	Asp	Phe	Ser	Asp	11e	Thr	Ala	λsπ	Ser	Phe	•
				95					100)				105	
Th	· Val	Hi	s Trs	ile	Ala	Pro	Arg	Ala	The	lle	Thr	Gly	Tyr	λrg	
				110)				115	5				120	
11	Ar:	вНі	s Hi	s Pro	Gli	Hi	s Phe	e Ser	GL	Arg	Pro	Arg	Gli	ASP	
				125	5			•	130)				135	
λr	g Va	l Pr	o Hi	s Se	r-Ar	g As	n Se	r 11	e Th	r Lei	ı Th	r As	n Le	u Thr	
				14	0	*			14	5				150	1
Pr	o G !	y Th	ır Gi	u Ty	r Va	l Va	i Se	r <u>.</u> 11	e Va	LAL	a Le	u As	n Gl	y Arg	;
				15	5				16	0				163	5

Glo	ı Git	ı Ser	Pro	Lei	ı Lei	lle	G [:	y Gla	Gin	Ser	The	Val	Sei	r Asp
				170)				175	i				180
۷al	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	٧a	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	lle	Ser	Tro	Asp	Ala	Pro	Ala	. Vai	Thr	Val	Arg	Tyr	Tva	
				200					205					210
Ιlε	Thr	Tyr	Gly	Glu	The	ĠĮy	Gly	Asn	Ser	Pro	Vai	Gin	Glo	
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	GIV	ion	
				230					235		•••	•.,	200	240
Pro	Gly	Va!	Asp	Tyr	Thr	He	Thr	. Va I		Ala	Val	The	Clv	
				245					250		,		017	255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lvs	Pro		900		١	т	
				260		-	-,-		265	361	116	7211	Lyr	
Thr	Glu	ile	λso		Pro	Sor	Ma)	Ala		n				270
				275		56,	met	nia	280	Pro	Ala	rro	Inr	
Leu	Lys	Phe	The		Val	The	0	Thr						285
	-,-			290		1 111		ını		Leu	Ser	Ala	Gin	
The	Pro	D - a	1		C1 -		. .	٠.	295					300
	110	110	7211	305	UIN	Leu	lär	Gly		λrg	Val	Arg	Val	Thr
0.0		C1			٠.	•			310					315
110	r A Z	Giu			Gly	Pro	Met	Lys		lle	Asn	Leu	Ala	Pro
				320					325					330
ASP	ser	Ser.			۷al	Vai	Ser	Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	Lys
				335					340					345

Tyr Glu Val Ser	Val Tyr Ala I	eu Lys Asp T	hr Leu Thr Ser	Arg
	350	355		360
Pro Ala Gin Giy	Val Val Thr	Thr Leu Glu A	sn Val Ser Pro	Pro
	365	370		375
Arg Arg Ala Arg	Val Thr Asp	Ala Thr Glu T	hr Thr Ile Thr	lle
	380	385		390
Ser Trp Arg Thr	Lys Thr Glu	Thr lle Thr C	Gly Phe Gla Val	Asp
	395	400		405
Ala Val Pro Ala	Asn Gly Gln	Thr Pro lie (in Arg Thr lie	Lys
	410	415		420
Pro Asp Val Ar	Ser Tyr Thr	lle Thr Gly 1	Leu Gla Pro Gly	Thr
	425	430		435
Asp Tyr Lys 11	Tyr Leu Tyr	Thr Leu Asn	Asp Asm Ala Arg	Ser
	440	445		450
Ser Pro Val Va	l'lle Asp Ala	Ser Thr Ala	lle Asp Ala Pro	Ser
	455	460		465
Asn Leu Arg Ph	e Leu Ala Thr	The Pro Asn	Ser Ļeu Lau Val	Ser
	470	475		480
Tra Gin Pro Pr	o Arg Ala Arg	lie Thr Cly	Tyr He He Ly:	Tyr
	485	490		495
Glu Lys Pro G	y Ser Pro Pro	Arg Glu Val	Val Pro Arg Pr	
	500	505	5	510
Pro Gly Val Ti	ir Glu Ala Thir	lle Thr Gly	Leu Glu Pro Gl	
	515	520		525

Glu	Tyr	Thr	lle	Tyr	۷ai	lle	Ala	Leu	Lys	Asn	λsn	Gln	Lys	Sei
				530					535					540
Glu	Pro	Leu	lle	Gly	Arg	Lys	Lys	Thr	Ásp	Ċlu	Leu	Pro	Gln	Leu
				545					550					555
Val	Thr	Leu	Pro	His	Pro	Asn	Leu	His	Gly	Pro	Glu	lle	Leu	Asp
				560					565					570

Val Pro Ser Thr

請求の範囲

- 1. 穿孔法を用いて外来遺伝子を標的細胞に導入し形質転換細胞を製造 する方法において、穿孔法を用いて標的細胞内に外来遺伝子の注入操作を 行った後、該細胞を細胞接着活性物質の存在下で培養する工程を包含する ことを特徴とする外来遺伝子による形質転換細胞の製造方法。
- 2. 培養工程が、細胞接着活性物質を被覆した培養器具を用いて培養する工程である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 3. 細胞接着活性物質が、細胞接着活性ポリペプチドまたは該ポリペプチドの機能的同等物である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 4. 細胞接着活性ポリペプチドが、細胞接着伸展活性ポリペプチドである 温度項3 記載の形質転換細胞の製造方法。
- 5. 細胞接着伸展活性ポリペプチドが、配列表の配列番号1で表される アミノ酸配列および/または配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列 を含有するポリペプチドである請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。
- 6. 細胞接着活性ポリペプチドか、配列表の配列番号3、4 および5 で 表されるポリペプチドから選択される請求項3 記載の形質転換細胞の製造 方法。
- 7. 細胞接着性物質がポリーN-p-ビニルベンジルーD-ラクトンアミドである請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 8. 標的細胞が造血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血細胞、ES細胞、リンパ球、癌細胞から選択される細胞である請求項1記載の形質転換細胞の 製造方法。
- 9. 外来遺伝子がタンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコード する核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞

内抗体をコードする核酸、偽(デコイ)遺伝子から選択される核酸である 請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。

- 10. 外来遺伝子がタンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞内抗体をコードする核酸、偽(デコイ)遺伝子から選択される核酸であり、該核酸がベクターに組み込まれている請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 11. ベクターがレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルベスウイルスベクターから選択されるベクターである請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 12. 穿孔法がエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション 法およびパーティクルガン法から選択される請求項1記載の形質転換細胞 の製造方法。
- 13. 請求項1記載の形質転換細胞の製造方法によって製造される外来 遺伝子による形質転換細胞。
- 14.請求項1記載の形質転換細胞の製造方法に使用するキットであって、細胞接着活性物質を含有することを特徴とする外来遺伝子による形質 転換細胞の製造用キット。

図 1

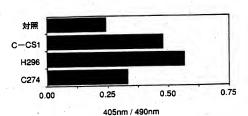
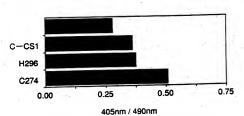


図2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02425

Α.	ON OF SUBJECT MATTER

Int. C16 C12N15/87, C12N5/10, C07K14/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C16 C12N15/87, C12N5/10, C07K14/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category®	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 4-063597, A (W.R. Grace & Co.), February 28, 1992 (28. 02. 92) & EP, 463508, A & CA, 2044307, A	1 - 14
A	JP, 6-090771, A (Shiseido Co., Ltd.), April 5, 1994 (05. 04. 94)(Family: none)	1 - 14
	*	1
	•	
Furthe	r documents are listed in the continuation of Box C. See patent family somex.	

	to be of particular relevance	the principle or theory underlying the invention
	"E" earlier document but published on or after the international filling dat	
	"L" document which may throw doubts on priority claim(a) or which cited to establish the publication date of another classics or other special reason (on specific)	stop when the document is taken alone
	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other	commissed to involve an investive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination
i	T demand a blished and a design of the latest and a second and the latest and a second a second and a second	
	"P" document published prior to the interactional filing data but later the the priority data claimed	"A" Assumed marrier of the same named family
	the priority date claimed Date of the actual completion of the international search	
		"&" decement member of the mane passes family Date of mailing of the international search report March 19, 1996 (19. 03. 96)

Authorized officer

Japanese Patent Offic Fecaimile No. Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

Name and mailing address of the ISA/

						
A. 発明の属	する分野の分類(国	服特許分類(IPC))	8			
	Int. CL	C12N15/87.	C12N5/10. C07K	14/78		
B. 漢蓋を行	った分野					
		0 = (1 P C))				
調査を行った最	小様資料(国際特許 Int. CL ⁶	C12N15/87.	C12N5/10, C07K	14/78		
最小程實料以外	の資料で調査を行っ	た分野に含まれるもの				
国際調査で使用		ス(データベースの名称、調査 I/L, BIOSIS LINE		-		
C. 関連する	と思められる文献	0.	1			
引用文献の カテゴリーキ	引用文向	は名 及び一部の部所が間違す	するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の書号		
A	アンド・カン 28.2月. &EP.46	バニー コーン)。 1992(28.02 3508, A&CA. 90771, A(株5	2044307, A	1-14		
□ C個の統	きにも文献が列挙され	1T1.5.	パテントファミリーに関する別			
3 (南文家のカテゴリー 「A) 特に環連のある文面ではなく、一般的技術を申を示すもの 「A) 特に環連のある文面ではなく、一般的技術を申を示すもの 「E) 允许支証ではあるが、国際部園目以後に公認されたもの 「L) 信先権主張に課題を侵略する文章文は他の立場の表示で 若しては他の例如で組織を重要するためた11所する文章 「(日) 口間による関係、使用:最外等に言及する文章 「P) 回路組織の質が、より個長期の主張の基度となる問題の日の後に公認された文章 「(本) 日本の大学、大学、大学、大学、大学、大学、大学、大学、大学、大学、大学、大学、大学、大						
国際調査を完	71.68 01.03	. 96	19.03	96		
名称及びあて日	本国特許庁([SA/JP)	特許庁等支官 (権限のある職員) 高 福 栄 二 ・	4 B 9 2 8 1		
東	毎世参号100 京都千代田区蔵:	が関三丁目4 3号		3449		

